

タンパク質相互作用解析. BMB2008, 神戸市, 2008年12月9日-12日.

- 15) 若尾雅広, 春山まみ, 大石紘, 齊藤彰寛, 満下宣子, 隅田泰生, イズロン酸を含むヘパラン硫酸部分二糖構造の合成. 日本化学会第89回春季年会, 千葉, 2009年3月27日-30日.
- 16) 齊藤彰寛, 出口弘史, 馬渡彩, 若尾雅広, 隅田泰生, ヘパラン硫酸部分構造の合成のためのウロン酸成分の高効率調製法. 日本化学会第89回春季年会, 千葉, 2009年3月27日-30日.
- 17) 山口憂三, 佐藤昌紀, 若尾雅広, 隅田泰生, ヘパラン硫酸生合成中間体糖鎖の合成. 日本化学会第89回春季年会, 千葉, 2009年3月27日-30日.
- 18) 小幡瑠美, 酒見千穂, 近藤宇男, 満下宣子, 若尾雅広, 隅田泰生, コンドロイチン硫酸部分二糖構造の合成とシュガーチップ化. 日本化学会第89回春季年会, 千葉, 2009年3月27日-30日.
- 19) 若尾雅広, 宮原つかさ, 橋口明典, 隅田泰生, ムチン型糖鎖 Core 3 構造の合成とシュガーチップ化. 日本化学会第89回春季年会, 千葉, 2009年3月27日-30日.
- 20) 若尾雅広, 田中小代里, 下釜宏美, 隅田泰生, コア成分に Au-Fe を用いる糖鎖固定化磁性ナノ粒子の調製. 日本化学会第89回春季年会, 千葉, 2009年3月27日-30日.

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

- 1) 隅田泰生, 奥野壽臣, 田村俊秀, 切替照雄, 切替富美子, 橋本雅仁, 青山和枝, 「グラム陽性菌由来で免疫増強活性を有する複合糖質の活性を抑制する抗体, およびその利用, 特許登録番号 4230282 登録日: 2008年12月12日
- 2) 隅田泰生, 西村知晃, 岸本裕子, 山下早希子, 鶴田祥子, 若尾雅広, 奥野壽臣, 「生体関連物質と糖鎖との相互作用の測定方法, 生体関

連物質の糖鎖選択性の評価方法, 生体関連物質の同定方法, および生体関連物質の差別化方法, 並びにこれらの方法を実施するためのキット」, 特開 2008-175813, 公開日: 2008年7月31日

- 3) 隅田泰生, 若尾雅広, 佐藤昌紀, 馬場昌範, 有馬直道, 伊東祐二, 「多岐用途型蛍光性リンカー化合物, 及びその製造方法ならびにそれらを用いて製造するリガンド複合体」, 特願 2008-108561, 出願日: 2008年4月18日
- 4) 隅田泰生, 西村知晃, 岸本裕子, 鶴田祥子, 奥野壽臣, 「微生物の濃縮方法」, 特願 2008-156020, 出願日: 2008年6月13日

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

6. 幹細胞生物学での技術開発と解析

分担研究者 國貞隆弘 岐阜大学大学院医学系研究科・教授

《研究要旨》

悪性脳腫瘍は再発率・致死率の高い腫瘍であり、外科手術と放射線が主な治療手段になっている。臨床成績を向上させるためには腫瘍の悪性度のより精密な判定、効果的な放射線量の決定、新規の化学療法・遺伝子治療の開発等が望まれる。そのためには、個々の腫瘍の性質を保持しその原因と考えられる腫瘍幹細胞を患者から単離し、それぞれの性質を詳しく調べることが必要である。我々は日本人の悪性脳腫瘍患者から脳腫瘍幹細胞株の樹立を行い、多くの患者から腫瘍幹細胞が分離可能であることを確認し、最終的に3人の患者から長期間維持可能な脳腫瘍幹細胞株（がん幹細胞株）を樹立することに成功した。これらの腫瘍幹細胞株はいずれも多分化能を持つこと、由来した患者の腫瘍と同じ病理組織学的な腫瘍をマウスに移植後も形成することから、腫瘍幹細胞（がん幹細胞）であると判断された。

A. 研究目的

近年、悪性脳腫瘍組織から自己複製能を有し、二次腫瘍を形成する元となる腫瘍幹細胞が単離され、腫瘍の概念に変革を迫っている(Singh S K et al, *Nature* 432, 396-401, 2004)。この概念によると、摘出術・化学療法・放射線療法等により一旦縮小をみた腫瘍が再増大することは、残存した腫瘍幹細胞が再度腫瘍形成を起していると考えられる。つまり、真の治療の標的は全腫瘍ではなく腫瘍幹細胞ということになる。本研究では、日本人脳腫瘍組織（多形性神経膠芽腫と診断された症例）を用いて長期間継代可能な腫瘍幹細胞株を誘導し、最近いくつかの海外の研究グループから報告されている悪性脳腫瘍から樹立された腫瘍幹細胞株と比較する。

B. 研究方法

【脳腫瘍からの腫瘍幹細胞株の樹立とEGFPによる標識】

新たな患者から研究期間を通じてなるべく多数の腫瘍幹細胞株の樹立を目指す。現在神経幹細胞の樹立に使用されている浮遊培養を基本にした標準的な培養法 (Kitajima H, Kunisada T et al, *Mol. Cell Neurosci.* 80, 467-474, 2004.) を採用しているが、増殖因子 (EGFなど) の濃度を最適化し、腫瘍幹細胞株の樹立成功率を高めた。腫瘍幹細胞の樹立を行っている研究者の共通の認識として、腫瘍幹細胞として分化能を保持した細胞を株化できる確率はそう高くない (我々の実績で10分の1)。樹立に成功するかどうかは、グレードや切除した組織の総量にはかなら

ずしも強く相関しない。初代培養時の細胞の密度、我々が発見した腫瘍幹細胞増殖因子として単独で最も効果のあるEGFの量、FGF2との組み合わせなどに配慮して、樹立の成功率の向上に努める。移植時の追跡を容易にするため、樹立された細胞株にEGFPを組み込んだレトロウイルス (293pgpEGFP) を感染させ、セルソーターで蛍光を発する細胞を精製し、株化する。このウイルスは遺伝子発現の抑制がかりにくく、細胞が分化した後も長期間にわたってEGFPを発現する。

【マウスへ移植後の脳腫瘍幹細胞の形態】

現在樹立している腫瘍幹細胞株を含めて樹立された腫瘍幹細胞株について、 10^6 程度の細胞を脳定位固定台に固定した免疫不全マウス (NOD/SCID) の脳室下帯へハミルトンシリンジで移植する。経時的にと殺し、腫瘍を形成すること、グリアとニューロンへ分化すること、マウス脳内に形成された腫瘍とそれぞれの細胞株が由来した患者の腫瘍組織との形態の類似性 (phenocopy) の程度を確認する。マウス脳内で患者の腫瘍組織に相同なphenocopyが形成されることは、腫瘍幹細胞の存在を最も強力に支持する根拠である。

【脳腫瘍幹細胞の化学療法・放射線への感受性の測定】

現在脳腫瘍治療に用いられているイレッサ等の抗がん剤について、適量の腫瘍幹細胞株を播種した96穴プレートでのコロニー形成率、血清存在下の接着培養を抗がん剤存在下で一週間続けた場合の増殖率をそれぞれ測定し、薬剤に対する感受性を評価する。放射線 (X線) について

も様々な照射量に対し同様にコロニー形成率、増殖率を測定する。このようにして得られた試験管内での薬剤の有効濃度を参考に、免疫不全マウスに腫瘍幹細胞を移植した後に薬剤を投与し、生体内での腫瘍幹細胞の腫瘍形成能の各種薬剤に対する感受性を測定する。放射線についても同様の生体内での感受性測定を行う。

C. 研究結果

悪性脳腫瘍患者の外科手術時に摘出された腫瘍塊を酵素で解離させ、EGF等を添加した神経幹細胞維持用の合成培地で培養した。17人の患者から樹立を試み、12人から球状の細胞塊が形成され、その7株が1ヶ月以上増殖を続けニューロン、グリア細胞への多分化能を示した。最終的に3人の患者から樹立された細胞が安定して長期間維持可能であった(X01GB, X02GB)とともにglioblastoma患者に、X03AOAはanaplastic oligoastrocytoma患者に由来)。いずれの腫瘍幹細胞株も神経幹細胞マーカーとして知られるnestin, musashi-1を発現し、腫瘍幹細胞に共通のマーカーとされるCD133をいずれも継続的に発現していたことから、未分化な腫瘍幹細胞を含む細胞集団として維持されていることが示唆された。実際、これらの細胞株を血清を含む分化培地へ移すと、いずれもTuj1陽性のニューロン、GFAP陽性のグリア細胞、GalC陽性のオリゴデンドログリア細胞に分化した。さらに、いずれの細胞株も、免疫不全マウス脳の線状帯へ移植すると腫瘍を形成し、しかもそれらの腫瘍は患者の腫瘍と組織病理学的な所見が一致した(phenocopy)。また、これらの細胞株から100ないし1000個のCD133陽性細胞のみをソートして移植しても同様の腫瘍が形成されたことから、これまでの研究で示唆されている腫瘍幹細胞集団が腫瘍形成能力を持つことも確認された。いずれの細胞株も、FGF2およびEGF存在下で樹立・維持しているが、新たにEGFのみで幹細胞として維持可能であることを見出した。

D. 考察

今回樹立された脳腫瘍幹細胞株は我が国で初めて樹立された日本人由来の腫瘍幹細胞株(がん幹細胞株)であり、腫瘍幹細胞の様々な研究対象として利用価値が高いと思われる。我々は現在、ゲフィチニブなどの抗ガン剤に対する感受性の測定を、様々な細胞シグナル阻害剤などと共にやっている。本研究班によって開発されたがん遺伝子治療の新しいストラテジーを検証する対象としても有用と考えられる

ので、共同研究を強力に推進したい。

E. 結論

- 1) 日本人の悪性脳腫瘍患者3人から長期間維持可能な脳腫瘍幹細胞株(がん幹細胞株)を樹立することに成功した。
- 2) いずれの腫瘍幹細胞株も神経幹細胞マーカーとして知られるnestin, musashi-1を発現し、腫瘍幹細胞のマーカーとされるCD133を発現していた。
- 3) 血清を含む分化培地へ移すと、いずれもTuj1陽性のニューロン、GFAP陽性のグリア細胞、GalC陽性のオリゴデンドログリア細胞に分化する幹細胞としての性質を持っていた。
- 4) いずれの細胞株も、免疫不全マウス脳の線状帯へ移植すると腫瘍を形成し、しかもそれらの腫瘍は患者の腫瘍と組織病理学的な所見が一致した(phenocopy)。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- イ) Takeda T, Tezuka Y, Horiuchi M, Hosono K, Iida K, Hatakeyama D, Miyaki S, Kunisada T, Shibata T, Tezuka K: Characterization of Dental Pulp Stem Cells of Human Tooth Germs. *J Dent Res.* 2008;87:676-681.
- ロ) Aoki H, Hara A, Niwa M, Motohashi T, Suzuki T, Kunisada T. Transplantation of cells from eye-like structures differentiated from embryonic stem cells in vitro and in vivo regeneration of retinal ganglion-like cells. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 2008;246:255-265.
- ハ) Kawaguchi A, Chiba K, Tanimura Y, Motohashi T, Aoki H, Takeda T, Hayashi SI, Shimizu K, Kunisada T. Isolation and characterization of Kit-independent melanocyte precursors induced in the skin of Steel factor transgenic mice. *Dev Growth Differ.* 2008;50:63-69.
- ニ) Oyama T, Yamada Y, Hata K, Tomita H, Hirata A, Sheng H, Hara A, Aoki H, Kunisada T, Yamashita S, Mori H. Further upregulation of beta-catenin/Tcf transcription is involved in the development of macroscopic tumors in the colon of ApcMin/+ mice. *Carcinogenesis.* 2008;29:666-672.
- ホ) Soeda A, Inagaki A, Oka N, Ikegame Y, Aoki H, Yoshimura SI, Nakashima S, Kunisada T, Iwama T. Epidermal growth factor plays a crucial role in mitogenic regulation of human brain tumor stem cells. *J Biol Chem.* 2008; 383: 10958-10966.
- ヘ) Aoki H, Yoshida H, Hara A, Suzuki T, Kunisada T. Transplantation of melanocytes into iris: method for iris repigmentation. *T Transplantation.* 2008;85:492-494.

- ト) Hara A, Aoki H, Taguchi A, Niwa M, Yamada Y, Kunisada T, Mori H. Neuron-like Differentiation and Selective Ablation of Undifferentiated Embryonic Stem Cells Containing Suicide Gene with Oct-4 Promoter. *Stem Cells Dev.* 2008;17:619-628.
- チ) Tsuji Y, Yoshimura N, Aoki H, Sharov A A, Ko MS, Motohashi T, Kunisada T. Maintenance of undifferentiated mouse embryonic stem cells in suspension by the serum- and feeder-free defined culture condition. *Dev Dyn.* 2008;237:2129-2138.
- リ) Aoki H, Hara A, Motohashi T, Chem H, Kunisada T. Iris as a recipient tissue for pigment cells: Organized in vivo differentiation of melanocytes and pigmented epithelium derived from embryonic stem cells in vitro. *Dev Dyn.* 2008;237:2394-2404.
- ス) Suetsugu A, Nagaki M, Aoki H, Motohashi T, Kunisada T, Moriwaki H. Differentiation of mouse hepatic progenitor cells induced by hepatocyte nuclear factor-4 and cell transplantation in mice with liver fibrosis. *Transplantation.* 2008 ;86:1178-86.

2. 学会発表

- イ) 20th International Pigment Cell Conference and 5th International Melanoma Research Congress (Aoki H, Kunisada T; Hokkaido, Japan, May8・2008, サテライトシンポジウム, Melanocytes in eye, hardierian gland and ear: Different requirement of Kit and Endothelin 3 signalings for the development of non-cutaneous melanocytes, invited co-author)
- ロ) 20th International Pigment Cell Conference and 5th International Melanoma Research

- Congress (Kunisada T; Hokkaido, Japan, May9・2008, Signal transduction and life cycle of melanocytes, invited speaker)
- ハ) 20th International Pigment Cell Conference and 5th International Melanoma Research Congress (Kunisada T; Hokkaido, Japan, May9・2008, CS-09:Signaling cascade in melanocyte and melanoma, co-chair person)
- ニ) 情報機構主催による再生医療セミナー、2008年7月23日、東京、幹細胞を用いた再生医療の可能性、招待
- ホ) 熊本大学グローバル COE リエゾンラボ研究会、2008年10月22日、熊本、Establishment of iPS cell bank from dental pulp stem cells and its possible use for regenerative medicine、招待講演
- ヘ) 第24回放影研重粒子医科学センター研究交流会(先端遺伝子発現研究グループ) 2008年10月23日、千葉、岐阜大学歯胚幹細胞バンクおよびiPS細胞バンクの樹立とiPS細胞を用いた再生医療の可能性、招待講演

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)

- 3. 特許取得
なし
- 2. 実用新案登録
なし
- 3. その他
なし

研究成果の刊行に関する一覧表レイアウト (参考)

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
Suda Y	Surface Plasmon Resonance and Sugar Chip Analysis for Sugar Chain-Protein Interactions	Taniguchi, N., Suzuki, A., Ito, Y., Narimatsu, H., Kawasaki, T., Hase, S	Experimental Glycoscience, Glycochemistry	Springer	東京	2008.8	124-126
隅田泰生	シュガーチップと糖鎖固定化金ナノ粒子の開発とウイルス検査への応用	成松 久	遺伝子医学MOOK 11 臨床糖鎖バイオマーカーの開発-糖鎖機能の解明とその応用(第2章第3編)	(株)メディカルドゥ	大阪	2008.9	104-109

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
1 室伏善照, 小賤健一郎	革新的癌治療薬となる遺伝子・ウイルス治療薬と肝疾患への再生医療	ケミカルエンジニアリング	54 (1)	32-38	2009
2 Esaki M, Takemura G, Kosai KI, Takahashi T, Miyata S, Li L, Goto K, Maruyama R, Okada H, Kanamori, H, Ogino A, Ushikoshi H, Minatoguchi S, Fujiwara T, Fujiwara H.	Treatment with an adenoviral vector encoding hepatocyte growth factor mitigates established cardiac dysfunction in doxorubicin-induced cardiomyopathy.	Am J Physiol Heart Circ Physiol.	294(2)	H1048-1057	2008
3 堀川良治, 小宮節郎, 小賤健一郎	増殖制御型アデノウイルスによる遺伝子治療	関節外科 基礎と臨床. メジカルビュー社.	27 (1)	132-133	2008

4	Wakao M, Saito A, Ohishi K, Kishimoto Y, Nishimura T, Sobel M, Suda Y	Sugar Chips Immobilized with Synthetic Sulfated Disaccharides of Heparin/Heparan Sulfate Partial Structure	Bioorg. Med. Chem. Lett.	vol.18, No.7	pp.2499-2504	2008.4
5	Imamura A, Yoshikawa T, Komori T, Ando M, Ando H, Wakao M, Suda Y, Ishida H, Kiso M.	Design and synthesis of versatile ganglioside probes for carbohydrate microarrays	Glycoconjugate J.	vol.25, No.3	pp.269-278	2008.4
6	Baba M, Okamoto M, Hamasaki T, Horai S, Wang X, Ito Y, Suda Y, Arima N.	Highly enhanced expression of CD70 on human T-lymphotropic virus type 1-carrying T-cell lines and adult T-cell leukemia cells	J. Virol.	vol.82, No.8	pp.3843-3852	2008.4
7	Nakamura-Tsuruta S, Kishimoto Y, Nishimura T, Suda Y	One-Step Purification of Lectins from Banana Pulp Using Sugar-immobilized Gold Nano-Particles (SGNPs)	Journal of Biochemistry	vol. 143, No.6	pp.833-839	2008.6
8	Fukase Y, Fujimoto Y, Adachi S, Suda Y, Kusumoto S, Fukase K	Synthesis of Rubrivivax gelatinosus Lipid A and Analogues for Investigation of the Structural Basis for Immunostimulating and Inhibitory Activities.	Bull. Chem. Soc. Jpn.	vol. 81, No. 7	pp.796-819	2008.7
9	Hirakawa M, Tanaka M, Tanaka Y, Okubo A, Koriyama C, Tsuji M, Akiba S, Miyamoto K, Hillebrand G, Yamashita T, Sakamoto T.	Age-related maculopathy and sunlight exposure evaluated by objective measurement.	Br J Ophthalmol.	92(5)	630-4.	2008 May
10	Arimura N, Ki-i Y, Hashiguchi T, Kawahara K, Biswas KK, Nakamura M, Sonoda Y, Yamakiri K, Okubo A, Sakamoto T, Maruyama I	Intraocular expression and release of high-mobility group box 1 protein in retinal detachment	Lab Invest	89(3)	278-89	2009 Mar

隅田泰生	(総説) シュガーチップと糖鎖固定化金ナノ粒子(SGNP)-糖鎖と蛋白質やウイルスとの結合相互作用を解析するための新しい分析ツール	MRS-J NEWS	vol.20, No.3	pp.4-6	2008.8
Sato M, Ito Y, Arima N, Baba M, Sobel M, Wakao M, <u>Suda Y</u>	High sensitivity analysis of naturally occurring sugar-chains, using a novel fluorescent linker molecule	The Journal of Biochemistry			In press

IV. 研究成果の刊行物・別刷

(収載論文 10 冊)

革新的癌治療薬となる遺伝子・ウイルス 治療薬と肝疾患への再生医薬

室 伏 善 照^{*1}・小 賤 健 一 郎^{**}

Yoshiteru Murofushi・Ken-ichiro Kosai

■ 鹿児島大学大学院医歯学総合研究科 遺伝子治療・再生医学分野 * 助教 博士(医学) ** 教授 博士(医学) ■

1. はじめに

遺伝子治療と再生医薬は、21世紀の革新的治療法としてその開発が期待されている。筆者らは、種々の難治性疾患に対して両治療法の開発を進めてきたが、本稿では、特に実用化を具体的に目指している独自開発の多因子制御による癌特異的増殖型アデノウイルスベクター(m-CRA; conditionally replicating adenovirus regulated with multiple tumor-specific factors)による癌治療、増殖因子のHB-EGF(Heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor)による肝疾患への再生医薬について、その現状と展望を紹介する。

2. 癌に対する遺伝子・ウイルス治療薬

2.1 癌遺伝子治療の背景と問題点

癌は、本邦や先進諸国における三大死因で年間死亡数も依然増加しており、革新的な癌治療法の開発は本邦の医療福祉の向上の観点からも最重要課題である。その有力候補の一つの遺伝子治療は、1991年の最初の癌患者への臨床試験以来、現在まで癌だけでも960の臨床プロトコルが世界中で認可され、多くの癌患者へ臨床試験がなされている。その結果、安全性はよく確認されたが、治療効果が当初期待されたような癌根治に近づくレベルには達していないことが明らかとなった。全ての癌治療法の根幹の問題は、“全て”の癌細胞を殺してしまわなければ再発して根治には至らないということであり、遺伝子治療の成功の鍵はそ

れを可能とする画期的な遺伝子導入ベクターと治療遺伝子を開発することに他ならない。

第一世代の癌遺伝子治療は、1990年代に臨床試験が進められたレトロウイルスによるサイトカイン遺伝子の *ex vivo* 導入法(切除癌細胞に *in vitro* 培養下で遺伝子導入し、放射線増殖不能化して体内に戻す)による癌免疫ワクチン療法である。これは、治療効果が不十分なことに加えて、多大な経費や労力の点からも一般医薬化には至らなかった。第二世代の癌遺伝子治療は、1990年代前半に開発された *in vivo* 遺伝子治療(癌結節に直接ベクターを注射して遺伝子導入する)であり、その主たるベクターはアデノウイルス(ADV; adenovirus)ベクターである。これでも治療効果が不十分だった主因の一つは、これらのベクターは“非”増殖型のベクターであるため、つまり *in vitro* でいくら遺伝子導入効率の高いベクターでも、*in vivo* の体内の全ての癌細胞にもれなく遺伝子を導入することは物理的に不可能、つまりベクター液の未到達の遺伝子“未”導入癌細胞の再増大、再発が起りえるからである(図1)。筆者らが米国で開発した全身性抗腫瘍免疫を効率よく獲得する“自殺遺伝子/サイトカイン遺伝子のコンビネーション遺伝子治療”^{1,2)}などいくつかの戦略は、遺伝子“未”導入癌細胞もある程度治療できる可能性はあるものの、その根本解決として現在開発が進められているのは癌特異的な増殖型ウイルスによる第三世代の遺伝子治療である。癌特異的増殖型ウイルスの代表はADVをベースとしたもので、CRA(Conditionally replicating

告されておらず、優れた戦略ではある一方で、ただか1因子で癌と正常の細胞を完全に区別することは難しいであろうという癌特異化(潜在的な安全性)の問題、ウイルス蛋白質のみに依存した治療効果の問題などが大きな課題として残っていた。そして、その課題を解決できない根幹の原因は非増殖型 ADV とは異なり、CRA は未だ効率的な標準化作製技術がないということである。つまり、そのため研究は非効率で、またより複雑に改変された高度な CRA の開発も困難だったのである。

これを解決するために筆者らは、上記の E1 に関する四つの癌特異化因子(変異 E1A, 変異 E1B をそれぞれ異なる癌特異的プロモーターで発現制御する)で同時に精密にウイルス増殖を制御すること(安全性の向上)が可能で、さらに治療遺伝子を搭載(癌治療効果を向上)し、ADV ゲノム部(感染指向性を決めるファイバー部などウイルスの性質決定部)の変更も簡単にできる、第四世代の遺伝子治療となる m-CRA(CRA regulated with multiple tumor-specific factors)作製技術を開発した(図1)³⁾。また、これは第二世代の“遺伝子治療”と第三世代の“ウイルス療法”の長所を融合した“遺伝子・ウイルス治療(Gene-Viro-Therapy)”となる、革新的な癌治療法へと展開できる可能性を持つ。m-CRA 作製技術の原理、プロトコルの詳細はすでに前著にて報告しているので^{3,4)}、本稿では要点だけを示す。その発想は、まず m-CRA の構成要素を“パーツ化”して、ADV 増殖制御部 E1, 治療遺伝子, ADV ゲノムを異なる三つのプラスミドに収載することで、各部分を独立して簡単に遺伝子組換えすることを可能とした。その後は、三つのプラスミドを簡単に“融合”させて、正しいものだけを確実に“選択”して一つの m-CRA プラスミドまで作製できるように種々の工夫を施している。

従来の“手作り”での CRA の作製効率(例えば専門家が年に1, 2個作製)と比較すれば、筆者らの“システム・プロトコル”化された m-CRA 作製技術は小スケール調整で同時に多種多様な検体を扱えることより、多検体の作製における作業効率は桁違いの向上率となるものである(例えば、テクニシャンが年間に数十個作製など)。

しかも、医薬あるいは Gene delivery tool としての性能が従来の CRA を大きく凌ぐ m-CRA も作製することができる。また各部をパーツ化しているため、バンク化したパーツの組み合わせでさらに多種多様の m-CRA の作製が可能で、また m-CRA の一部の改変も極めて容易である。この m-CRA 作製技術により、CRA, m-CRA の受託作製の事業化も初めて可能となるため、筆者らはベンチャー創業(平成22年3月予定)により自身らで癌への遺伝子・ウイルス治療薬の創薬・臨床開発を進める一方で、優れた Gene delivery tool あるいは癌治療研究用として研究者や企業へ受託作製の事業化を行う計画をし、その準備を進めている。

2.3 癌に対する遺伝子・ウイルス治療薬としての m-CRA

筆者らが m-CRA 作製技術により、当初種々の m-CRA を作製して解析したが、医薬化を進める目的でオリジナル癌治療薬として開発した第一弾 m-CRA は Survivin 反応性 m-CRA(Surv.m-CRA)である⁵⁾。Survivin は、1997年にアポトーシス阻害蛋白質(IAP)ファミリーの一つとして同定されたが、その後ほとんどの癌で高発現し、分化した正常細胞ではほとんど発現していないことが分かった。さらに Survivin の発現が癌の悪性度と相関することも明確となり、現在 Survivin 抑制を目指した医薬開発も試みられている。筆者らはまず、Survivin プロモーターで E1A(あるいは変異 E1A)を発現制御し、E1B も変異化した 2, 3 因子制御の Surv.m-CRA を開発した。Surv.m-CRA は、*in vitro* および *in vivo* において非常に高い癌特異性を示し、さらに既存の中では最も優れた CRA の一つと思われるテロメラーゼ(hTERT; human telomerase reverse transcriptase)反応性 m-CRA(Tert.m-CRA)との詳細な比較実験でも、Surv.m-CRA は Tert.m-CRA よりも癌特異性(安全性)および癌治療効果の両面で遥かに凌ぐ性能を示した⁶⁾。上記のように Survivin はほとんどの癌で高発現していることが知られているため、Surv.m-CRA は多くの癌を対象とした画期的な癌治療薬となることが期待される。

さらに筆者らは、癌治療効果と癌特異化(安全

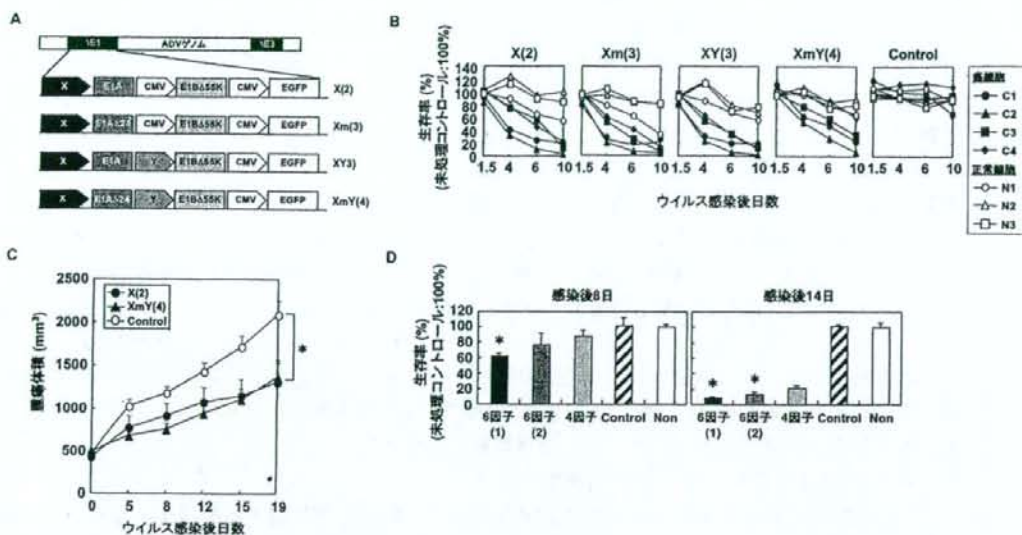


図2 癌に対する遺伝子・ウイルス治療薬としてのm-CRA

性)がさらに向上した新型 Surv.m-CRA を開発する目的ならびに最適の m-CRA 化の一般法則とそのメカニズムを同定する目的で、種々の Surv.m-CRA を含む m-CRA を種々作製し、解析している。(新型 Surv.m-CRA は未だ発表できないため)ここでは2種類の異なる癌特異的遺伝子のプロモーター(X, Y), E1A と E1B の野生型/変異型を組み合わせた最大4因子の異なる癌特異化因子で増殖制御する4種類の m-CRA の解析結果を示す(図2A~C)。比較解析の結果, *in vitro*において4種類の全ての m-CRA は癌特異的ウイルス増殖と強い癌治療効果を示した(図2B)。また, より多くの癌特異化因子(最大の4因子)で増殖制御することにより, 癌治療効果を維持したまま正常細胞での細胞傷害を抑制する, つまり癌特異性を向上できるという成果が得られた。さらには *in vivo*においても同様の結果が得られ, 4因子制御 m-CRA は *in vitro*において最も強い癌治療効果を示した2因子制御 m-CRA と同等に腫瘍の増殖抑制・退縮を示した(図2C)。つまり, E1 をより高度に m-CRA 化することで“癌治療効果を減弱することなく”, さらに“癌特異性(安全性)を向上することが可能である”ことが明確となった(図2A~C)。筆者らはさらに, この E1 を4因子制御したより癌特異性(安全性)が増した

m-CRA に, さらに2種類の異なる治療遺伝子ユニット(癌特異的治療遺伝子を癌特異的プロモーターで発現制御する)を組んだ6因子制御 m-CRA を作製し, 比較実験をしてさらに治療効果を増強する m-CRA を開発することにも成功している(図2D)。また, 癌への感染指向性が向上したファイバー改変型 m-CRA も作製, 解析しており, これらの成果を導入した7因子制御の新型 Surv.m-CRA を現在開発しているところである。上記のように(2, 3因子制御の筆者らにとってプロトタイプ), Surv.m-CRA ですら従来の CRA の性能を凌いでいたため, 従来の CRA の課題を克服しつつある新型 Surv.m-CRA は画期的な癌治療薬となるものと思われる。

また, 筆者らはこれまでに標的とされていない癌特異化因子あるいは分子機構を標的とした, Surv.m-CRA に続く第二, 第三弾の m-CRA 開発を進めている。一方, 上記のように m-CRA ベクターは画期的な Gene delivery tool にもなるため, 医薬開発あるいは研究用として有用な shRNA 発現 m-CRA システムも開発を進めている。これらのシステムも順次, 医薬開発あるいは研究や開発支援の受託作製の事業へと展開して行きたいと思っている。

3. 肝疾患に対する再生医療としての HB-EGF

3.1 再生医学の背景

再生医学(医療)とは、失われた組織を補完するさまざまな治療法の総称であるが、以下の二つに大別することができる⁹⁾。一つは昨今流行のiPS細胞やES細胞といった多能性幹細胞により目的細胞を分化誘導・単離して細胞移植療法に用いるというもので、臓器移植に代わる治療法を目指した、“再生医学”ともいうべきものである。もう一つの再生医学は、何か物質を投与したらトカゲの尻尾のように失われた臓器が蘇ってまさに“再生”してくるというような、おそらく一般の人が思い描いている再生医学に近いものである。“生体内再生医学”ともいうべき後者の適応臓器は、生後も再生能を保持している肝臓、皮膚、血管、血球などに限られるため、筆者らも心臓や神経などの臓器疾患には前者の“再生医学”を主体として、ES細胞などで独自の技術開発を進めている⁶⁻⁸⁾。一方、肝臓はヒトでも生体肝移植が可能のようにその再生能力が極めて高いことから、筆者らは肝臓はまさに“生体内再生医学(医療)”の理想的な対象臓器と考え、その開発を行ってきた。特に本邦やアジア諸国では肝疾患患者数は多く、急性肝炎は本邦だけで毎年約20万人の発症があるといわれているように、肝疾患への画期的な治療薬の開発は重要である。多くの肝疾患、例えば急性肝炎への既存の医療、医療は単なる対症療法にすぎず、極論すれば安静、栄養補給だけで肝臓の元来の再生能力に全面的に依存して自然治癒を待っているだけであり、つまり“病気の進展をほぼ完全に止め、治癒再生を劇的に促す”根治医療というものは未だ存在しないのが現状である。移植以外に有効な治療法がない、短期間で極めて高い致死率を示す(数日から数週間で60~70%の致死率)という点で、劇症肝炎は代表的な難治性肝疾患である。そこで筆者らは初めに、劇症肝炎に対する生体内再生治療法(薬)の開発を、増殖因子のHGF(Hepatocyte growth factor)を用いて行った⁹⁻¹¹⁾。

HGFは、肝再生の本体の因子として1984年に単離、1989年にクローニングされた増殖因子で

ある。血清HGFは劇症肝炎患者で急激な上昇がみられ、予後判定のマーカーともなっているが、血清で上昇しているHGFは一本鎖や断片化した活性を持たないあるいはむしろ活性を阻害しているHGFも多分に検出されていることも示唆されている。よって、活性型の二本鎖の組換えHGF蛋白質を多量投与して人為的に補うことで、本来の生理的効果を回復し、劇症肝炎の発症が阻止、治療できるのではないかと考え、二つの劇症肝炎モデルで治療実験を行った^{10,11)}。その結果、当時分かっていたHGFの強力な肝再生誘導作用だけでなく、このHGFの抗アポトーシス効果を中心とする肝細胞死の抑制作用が極めて強力であった¹⁰⁻¹²⁾。つまりヒト劇症肝炎は、数日から数週間で60~70%が死亡するものであるが、Fas誘導、エンドトキシン誘導の二つの劇症肝炎マウスモデルは、これとは比較にならないほど急激かつ重篤な劇症肝炎モデルである。特に後者は、肝障害発症から3~4時間以内に100%死亡するという激しい劇症肝炎マウスモデルであるが、HGF投与によりその死亡率は30%以下へと強力に抑制された^{10,11)}。このように強力な治療効果と、そして元来の生体内物質であるという点からも、科学的結果からはHGFの蛋白質製剤は急性/劇症肝炎への根治薬となりえるものと推察される。

3.2 HB-EGFによる肝再生医療の開発と展望

筆者らは、このようにHGFをモデルとして、“病気の進展(細胞死)を止め、同時に障害臓器を再生治癒する”という理想的な生体内再生医療の戦略を初めて報告した。しかし、一方でHGF自体はすでにさまざまな分野で研究が進み、また、医薬開発も発見者を中心に種々進められている。そこで筆者らは、自身で提唱した理想的な“生体内肝再生医療”の戦略は基盤としながらも、医薬応用はまだなされておらず、しかもHGFを凌ぐ性能を持つ可能性のある物質としてHB-EGF(Heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor)を候補と考えその検証を行った。

HB-EGFは、最初はジフテリアトキシン受容体として発見されたが、その後EGFファミリーに属する新規増殖因子としての役割を併せ持つことが明らかとなった。HB-EGFはインテグリン

ケミカル・エンジニアリング

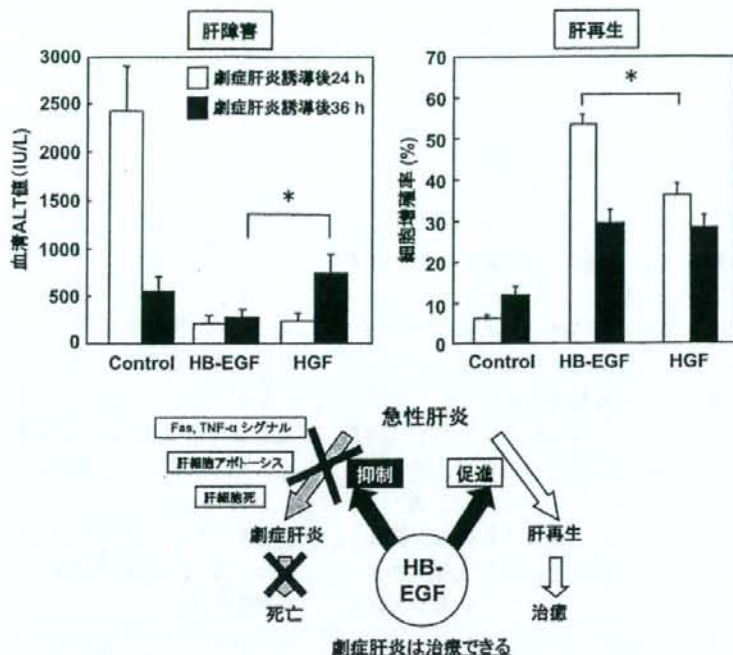


図3 肝疾患に対する再生医薬としてのHB-EGF

や Tetraspanin ファミリーなどとアソシエートする膜結合型増殖因子であり、まずは膜アンカー型の proHB-EGF として産生された後に、特定のメタロプロテアーゼにより切り出されて、活性型の可溶性 HB-EGF が産生される。肝障害や肝再生の際には Kupfer 細胞や類洞内皮細胞で HB-EGF の発現が上昇し、特に興味深いのは肝障害後には HGF よりも早期に急激に HB-EGF は上昇するという点である。しかし、治療への応用という観点からさまざまな臓器疾患で研究が進められている HGF とは異なり、それまで HB-EGF の医薬応用の可能性について検証した報告はなかった。特に、生物学レベルでは多少想像された肝再生誘導作用とは違い、抗アポトーシス作用あるいは肝細胞死の阻止作用という観点での HB-EGF の研究は報告がなかった。

筆者らは、遺伝子治療の専門家であり、上記のような ADV ベクター技術を持つため HB-EGF ならびに HGF を発現する ADV ベクターをそれぞれ作製し、マウスの尾静脈投与による肝細胞への HB-EGF、HGF 遺伝子導入・強発現により Fas 誘導の急性肝炎に対する肝障害抑制作用、肝

再生誘導作用を比較した(図3)¹⁾。その結果、HB-EGF は HGF よりもある時点で強力な肝障害抑制効果を示し、さらに肝障害早期の肝再生誘導効果は HB-EGF は HGF を大きく凌いでいた。つまり、上記のように強力な肝細胞死の抑制効果と肝再生誘導効果を示した HGF の両作用をさらに凌ぐ HB-EGF 医薬の性能は、医薬として極めて高く期待できるものと結論づけられる(図3)。今回は遺伝子治療(導入)の実験手技を用いたが、実際に第一適応として開発を進める急性/劇症肝炎への医薬形態としては、遺伝子医薬より蛋白質製剤の方がより現実的で有用だと思ひ、そのように医薬開発を進めて行きたいと思っている。

HB-EGF 生体内再生医薬の長所をまとめると、以下ようになる。①肝疾患への既存医薬は対症療法にすぎないが、HB-EGF は根治薬となる可能性が大きい。②投与法は簡便である(肝障害をみつけたら HB-EGF の静脈注射で病気は止まり、治療に向かう)。③HB-EGF は HGF よりさらに肝細胞死抑制、肝再生誘導の両効果とも強い(特に急性肝障害への再生誘導効果は際立っている)。④応用特許としても新規性が高い(特許性高い；

まだ HGF ほど研究されていない)。⑤急性肝炎への蛋白質製剤としての開発は極めて現実的である。⑥活性を持つ組換え蛋白質を大腸菌で産生可能。よって、GMP での大量生産も容易と思われる。⑦他の肝疾患へも適応拡大が期待できる。このように HB-EGF の再生医薬としての実用化の可能性は大きく、肝硬変をはじめ他の肝疾患への治療効果の検証を進める一方で、一刻も早い一般製薬化実現による患者さんへの恩恵のため、急性/劇症肝炎への HB-EGF 蛋白質製剤の臨床開発をいずれかの製薬会社と共同で進めて行ければと願っている。

参考文献

- 1) Chen S.H., Kosai K., et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, (1995) 92 : 2477-2581
- 2) Chen S.H., Kosai K., et al., *Cancer Res.*, (1996) 56 : 3758-3762

- 3) Nagano S., Kosai K., et al., *Gene Ther.*, (2005) 12 : 1385-1393
- 4) 室伏善照, 小沢健一郎, *細胞工学*, (2006) 25 : 60-66
- 5) Kamizono J., Kosai K., et al., *Cancer Res.*, (2005) 65 : 5284-5291
- 6) 高橋知之, 小沢健一郎, *再生医療*, (2006) 5 : 43-51
- 7) Takahashi T., Kosai K., et al., *Mol Ther.*, (2006) 14 : 673-683
- 8) Kawai T., Kosai K., et al., *Circ J.*, (2004) 68 : 691-702
- 9) 高橋知之, 小沢健一郎, *細胞増殖因子と再生医療*, 7. HGF 急性/劇症肝炎, (2006) : 199-204
- 10) Kosai K., Matsumoto K., et al., *Hepatology*, (1999) 30 : 151-159
- 11) Kosai K., Matsumoto K., et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, (1998) 244 : 683-690
- 12) Kosai K., Finegold M.J., et al., *Human Gene Ther.*, (1998) 9 : 1293-1301
- 13) Khai N.C., Kosai K., et al., *J Hepatol.*, (2006) 44 : 1046-1054

■ 新刊案内 ■

Excelで学ぶ化学工学



Excelで学ぶ化学工学

— Excelファイルで簡単に自習できる。

148題全問回答入りCD-ROM付 —

吉川 英見、川瀬 義矩 著 B5判 218頁 定価3,675円

大学生がノートパソコンを使いながら講義を受ける時代が近づいてきている。電卓を使って化学工学を勉強する時代は終焉を迎えようとしている。電卓で解ける解析解の式が得られている簡単な問題だけを講義で勉強する昔ながらのスタイルでは現在の技術進歩についていけない。より実際の解析解のない問題も講義で解くことにより初めて化学工学の重要性を理解できる。化学工場の実務に即した多くの問題を演習の形で実際に解くことによりケミカルエンジニアとしての実力を養うことができる。化学工学の根幹である物質収支、熱収支、単位操作(蒸留、ガス吸収、液液抽出、吸着、機械的分離など)、反応工学、最適化、経済計算を Excel を使って学べるように多くの例題を用いて解説してある。問題すべてについて「問題」、「実習」、「解答」のシートから構成されている Excel ファイル(ファイル名には問題の番号が付けてある)が添付の CD-ROM に入っており、「実習」シートを用いて自分で「解答」シートで答えをチェックしながら学べるように構成した。実務にも使える問題が数多く載せられているので、現場のエンジニアにも役立つ本である。

第1章 Excelの基礎—Excelを上手に使うために—
データの入力・コピー(データ入力も簡単に)/数式の入力(数式を上手に使う)/関数(組み込まれている関数を使えば計算も簡単)/グラフ作成(グラフも Excel では楽々作成)/近似曲線の追加(クリックだけでデータの相関式が得られる)/Excel で収束計算を始める前の設定(Excel には収束計算ツールが組み込まれている)

第2章 Excel VBAの基礎—Excelをさらに上手に使うために—

VBA・VBE の操作はこれだけ知っていれば大丈夫(マクロ作成ツール VBE の操作は易しい)/マクロ(プログラム)の作成(マクロの構成)/セルの値の操作(VBAから Excel シートのセルを操作する)/変数(値を記憶する箱)/制御文

(1)If 文(判断、場合分け)/ステップイン(1行ずつ実行して計算をチェック)/制御文(2)For 文(繰り返し操作、和を求める)/制御文(3)Do Loop 文(条件内での繰り返し操作)/配列(値を格納する箱の並び)/Function とサブプログラム(プログラムの部門化)/デバッグ(誤りを見つけ、訂正する)

第3章 Excelの化学工学への応用

物質収支と熱収支/蒸留/ガス吸収/液液抽出/吸着/蒸発・調湿・乾燥/機械的分離/反応工学/最適化・経済計算

第4章 演習問題

問題索引

発行/化学工業社 <http://www.kako-sha.co.jp>

Treatment with an adenoviral vector encoding hepatocyte growth factor mitigates established cardiac dysfunction in doxorubicin-induced cardiomyopathy

Masayasu Esaki,¹ Genzou Takemura,¹ Ken-ichiro Kosai,² Tomoyuki Takahashi,² Shusaku Miyata,¹ Longhu Li,¹ Kazuko Goto,¹ Rumi Maruyama,¹ Hideshi Okada,¹ Hiromitsu Kanamori,¹ Atsushi Ogino,¹ Hiroaki Ushikoshi,¹ Shinya Minatoguchi,¹ Takako Fujiwara,³ and Hisayoshi Fujiwara¹

¹Division of Cardiology, Gifu University Graduate School of Medicine, Gifu; ²Division of Gene Therapy and Regenerative Medicine, Cognitive and Molecular Research Institute of Brain Diseases, Kurume University, Kurume; and ³Department of Food Science, Kyoto Women's University, Kyoto, Japan

Submitted 22 September 2007; accepted in final form 7 December 2007

Esaki M, Takemura G, Kosai K-i, Takahashi T, Miyata S, Li L, Goto K, Maruyama R, Okada H, Kanamori H, Ogino A, Ushikoshi H, Minatoguchi S, Fujiwara T, Fujiwara H. Treatment with an adenoviral vector encoding hepatocyte growth factor mitigates established cardiac dysfunction in doxorubicin-induced cardiomyopathy. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 294: H1048–H1057, 2008. First published December 14, 2007; doi:10.1152/ajpheart.01102.2007.—Hepatocyte growth factor (HGF) reportedly exerts beneficial effects on the heart following myocardial infarction and during nonischemic cardiomyopathy, but the precise mechanisms underlying the latter have not been well elucidated. We generated nonischemic cardiomyopathy in mice by injecting them with doxorubicin (15 mg/kg ip). Two weeks later, when cardiac dysfunction was apparent, an adenoviral vector encoding human HGF gene (Ad.CAG-HGF, 1×10^{11} particles/mouse) was injected into the hindlimb muscles; LacZ gene served as the control. Left ventricular dilatation and dysfunction normally seen 4 wk after doxorubicin administration were significantly mitigated in HGF-treated mice, as were the associated cardiomyocyte atrophy/degeneration and myocardial fibrosis. Myocardial expression of GATA-4 and a sarcomeric protein, myosin heavy chain, was downregulated by doxorubicin, but the expression of both was restored by HGF treatment. The protective effect of HGF against doxorubicin-induced cardiomyocyte atrophy was confirmed in an *in vitro* experiment, which also showed that neither cardiomyocyte apoptosis nor proliferation plays significant roles in the present model. Upregulation of c-Met/HGF receptor was noted in HGF-treated hearts. Among the mediators downstream of c-Met, the activation of extracellular signal-regulated kinase (ERK) was reduced by doxorubicin, but the activity was restored by HGF. Levels of transforming growth factor- β 1 and cyclooxygenase-2 did not differ between the groups. Our findings suggest the HGF gene delivery exerts therapeutic antiapoptotic/degenerative and antifibrotic effects on myocardium in cases of established cardiac dysfunction caused by doxorubicin. These beneficial effects appear to be related to HGF-induced ERK activation and upregulation of c-Met, GATA-4, and sarcomeric proteins.

heart failure

THE ANTINEOPLASTIC DRUG doxorubicin is highly effective against a broad spectrum of hematogenous and solid human malignancies, but its clinical use is limited by its adverse side effects: irreversible degenerative cardiomyopathy and congestive heart failure (29, 32). Much effort has gone into the

search for treatments able to reduce or eliminate the risk of doxorubicin-induced cardiomyopathy and congestive heart failure (11, 31, 33), but so far the ability of these treatments to protect the heart from damage has been varied and limited.

Hepatocyte growth factor (HGF), which was originally identified and cloned as a potent mitogen for hepatocytes (25, 26), has been shown to exert mitogenic, angiogenic, antiapoptotic, and antifibrotic effects in various cell types, especially in epithelial and endothelial cells (5, 14). Moreover, HGF also reportedly exhibits cardioprotective effects. For instance, HGF protected cardiomyocytes from acute ischemic death during myocardial infarction (27, 36), and it enhanced survival among cardiomyocytes subjected to oxidative stress (13, 36). In addition to its beneficial effects on cardiomyocytes under acute stress, recent research has demonstrated that HGF also exerts beneficial effects on cardiac function in animal models of chronic heart diseases, including ischemic cardiomyopathy following old myocardial infarction and hereditary cardiomyopathy (18, 28, 34). In those cases, the main mechanisms appeared to be a hypertrophic effect on cardiomyocytes as well as angiogenic and antifibrotic actions. More recently, Iwasaki et al. (12) reported that HGF prevents cardiac dysfunction in an animal model of doxorubicin-induced cardiomyopathy. In that study, however, HGF was administered as the protein form, and the delivering method of HGF was very specific (intravenous injection of HGF delivered by ultrasound-mediated destruction of microbubbles). The effect of the HGF gene therapy has not been reported so far on established cardiac dysfunction due to doxorubicin cardiomyopathy.

Our hypothesis in the present study was that late treatment with HGF gene transfer can mitigate established heart failure brought on by doxorubicin-induced cardiomyopathy. To test that idea, we used an adenoviral vector to transfer the human (h)HGF gene into mouse hindlimbs (systemic transfection) 2 wk after doxorubicin injection, a time at which cardiac dysfunction was already apparent. We then examined the effects of the gene on the progression of heart failure during a more chronic stage and investigated the specific mechanisms involved.

Address for reprint requests and other correspondence: G. Takemura, Div. of Cardiology, Gifu Univ. Graduate School of Medicine, 1-1 Yanagido, Gifu 501-1194, Japan (e-mail: gt@gifu-u.ac.jp).

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. The article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

MATERIALS AND METHODS

Recombinant adenoviral vectors. The adenoviral vector plasmid pAd-HGF, which is comprised of the cytomegalovirus immediate early enhancer, a modified chicken β -actin promoter, rabbit β -globin polyA (CAG) and hHGF cDNA (Ad.CAG-HGF), was constructed using the *in vitro* ligation method described previously (18, 21). Control Ad-LacZ (Ad.CAG-LacZ) was prepared as described previously (7).

Measurement of hHGF levels. hHGF levels in plasma and tissues ($n = 3$ to 4/group) were measured using an ELISA kit (Institute of Immunology) as previously reported (18).

Experimental protocols. This study was approved by our Institutional Animal Research Committee and conformed to the animal care guidelines of the American Physiological Society. Cardiomyopathy was induced in 10-wk-old male C57BL/6J mice (Chubu Kagaku, Nagoya, Japan) by a single intraperitoneal injection of doxorubicin (doxorubicin hydrochloride, Kyowa Hakko, Tokyo, Japan) at a dose of 15 mg/kg. We previously confirmed both functionally and histologically that, at that dosage, doxorubicin induces cardiomyopathy in all mice not receiving a therapeutic intervention (16). In sham-operated mice, the same volume of saline was injected in a similar manner.

In the first set of experiments (*protocol 1*), treatment with adenoviral vectors was started 2 wk after saline or doxorubicin injection; Ad.CAG-HGF or Ad.CMV-LacZ at 1×10^{11} particles/mouse was injected into the hindlimb muscles of 10-wk-old male C57BL/6J mice. At that time, mice were assigned to receive saline alone ($n = 11$), doxorubicin plus LacZ gene ($n = 10$), or doxorubicin plus hHGF gene ($n = 9$). Before this assignment, echocardiography was done to reduce any bias among the groups. After an additional 2 wk (4 wk after doxorubicin administration), all mice received a physiological examination and were then euthanized with an overdose of pentobarbital sodium. Cardiac specimens were then collected and subjected to histological, immunohistochemical, and molecular biological analyses.

In a second set of experiments (*protocol 2*), we evaluated the role played by the extracellular signal-regulated protein kinase (ERK) signaling pathway in mediating the effects of the hHGF gene therapy. PD-98059 (Cell Signaling), a MEK1-p42/p44 mitogen-activated protein kinase (MAPK)-specific inhibitor (8), was administered intraperitoneally at a dose of $0.5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{day}^{-1}$ for 2 wk to mice given saline or doxorubicin plus hHGF ($n = 7$ each), after which the mice were examined as described in *protocol 1*.

In vitro study. Cardiomyocytes were isolated from 1-day-old neonatal C57BL/6J mice as previously reported (3) and plated on laminin-coated dishes or in slide glass chambers and incubated in Dulbecco's modified Eagle's medium (Sigma) supplemented with 10% FBS (Sigma) for 48 h at 37°C . Doxorubicin was then added to the medium to a final concentration of $0.1 \mu\text{mol/l}$. Simultaneously, recombinant hHGF (Wako) was added to a concentration of 0, 0.02, 0.2, 2, or 10 ng/ml. For the controls, doxorubicin and/or HGF was replaced with the same volume of saline. Twenty-four hours later, the cells were collected for morphometric and biochemical analyses.

The cardiomyocytes in slide glass chambers were fixed in 4% paraformaldehyde, permeabilized with 0.05% Triton X, and stained with rhodamine phalloidin and Hoechst 33342 (both from Molecular Probes). Digital images captured using a laser-confocal microscope system (LSM510, Zeiss) were employed for morphometric analysis using Photoshop 7.0 (Adobe Systems). Proteins extracted from cardiomyocytes on dishes were used for Western blot analysis.

Physiological studies. Echocardiography and cardiac catheterization were carried out as described previously with modifications (16). Animals were anesthetized with halothane (induction, 2%; maintenance, 0.5%) in a mixture of N_2O and O_2 (0.5 l/min each) via a nasal mask. Echocardiograms were recorded using an echocardiographic system (Vevo770, Visualsonics) equipped with a 45-MHz imaging

transducer before treatment and at death. Following echocardiography, the right carotid artery was cannulated with a micromanometer-tipped catheter (SPR 671, Millar Instrument) that was advanced into the aorta and then into the left ventricle for recording pressure and maximal and minimal first derivative of pressure ($\pm \text{dP/dt}$).

Histological analysis. Following echocardiography, each heart was removed and cut into three transverse slices. Of those, the middle slice was fixed with 10% buffered formalin and embedded in paraffin, after which $4\text{-}\mu\text{m}$ -thick sections were stained with hematoxylin-eosin or Sirius red F3BA (0.1% solution in saturated aqueous picric acid) (Aldrich). Quantitative assessments, including cell size and cell number, were carried out in randomly chosen high-power fields (HPFs) in each section using a multipurpose color image processor (LUZEX F, Nireco). The fibrotic area was measured by searching the entire ventricle. Cardiomyocyte size (expressed as the transverse diameter of myocytes cut at the level of the nucleus) and cell populations were assessed in 20 randomly chosen HPFs in each section.

Immunohistochemistry. After deparaffinization, the $4\text{-}\mu\text{m}$ -thick sections were incubated with a primary antibody against c-Met/HGF receptor (Santa Cruz), endothelial cells (Flk-1, Santa Cruz), leuko-

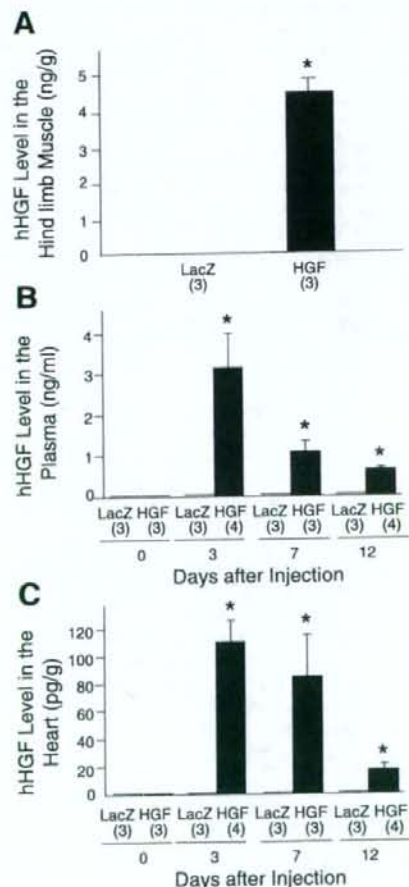


Fig. 1. A: human hepatocyte growth factor (hHGF) levels in the hindlimb muscles of mice injected with adenoviral vector 3 days earlier were detected by ELISA. B: time course of hHGF levels in the plasma of mice after adenovirus injection. C: time course of hHGF levels in the heart. Numbers in parentheses indicate those of animals used per group. * $P < 0.05$ vs. doxorubicin (Dox) + LacZ group.

cytes (CD45, Pharmingen), or Ki-67 (Santa Cruz). A Vectastain Elite ABC system (Vector) was then used to immunostain the sections; diaminobenzidine served as the chromogen, and the nuclei were counterstained with hematoxylin. Quantitative assessments, including the number or area of the immunopositive cells, were made in 20 randomly chosen HPFs using the multipurpose color image processor.

In situ terminal dUTP nick-end labeling (TUNEL) assays were carried out with sections using an ApopTag kit (Chemicon) according to the supplier's instructions. Mouse mammary tissue served as a positive control.

Electron microscopy. Cardiac specimens were immersion fixed overnight in phosphate-buffered 2.5% glutaraldehyde (pH 7.4), post-fixed for 1 h with 1% osmium tetroxide, dehydrated through a graded ethanol series, and embedded in Epon medium. Ultrathin sections were stained with uranyl acetate and lead citrate and observed in an electron microscope (H700, Hitachi, Tokyo, Japan).

Western blot analysis. Heart tissue lysates were used for Western blot analysis. Proteins were separated and transferred to membranes using standard protocols, after which they were probed using antibodies against GATA-4 and myosin heavy chain (MHC) (both from Santa

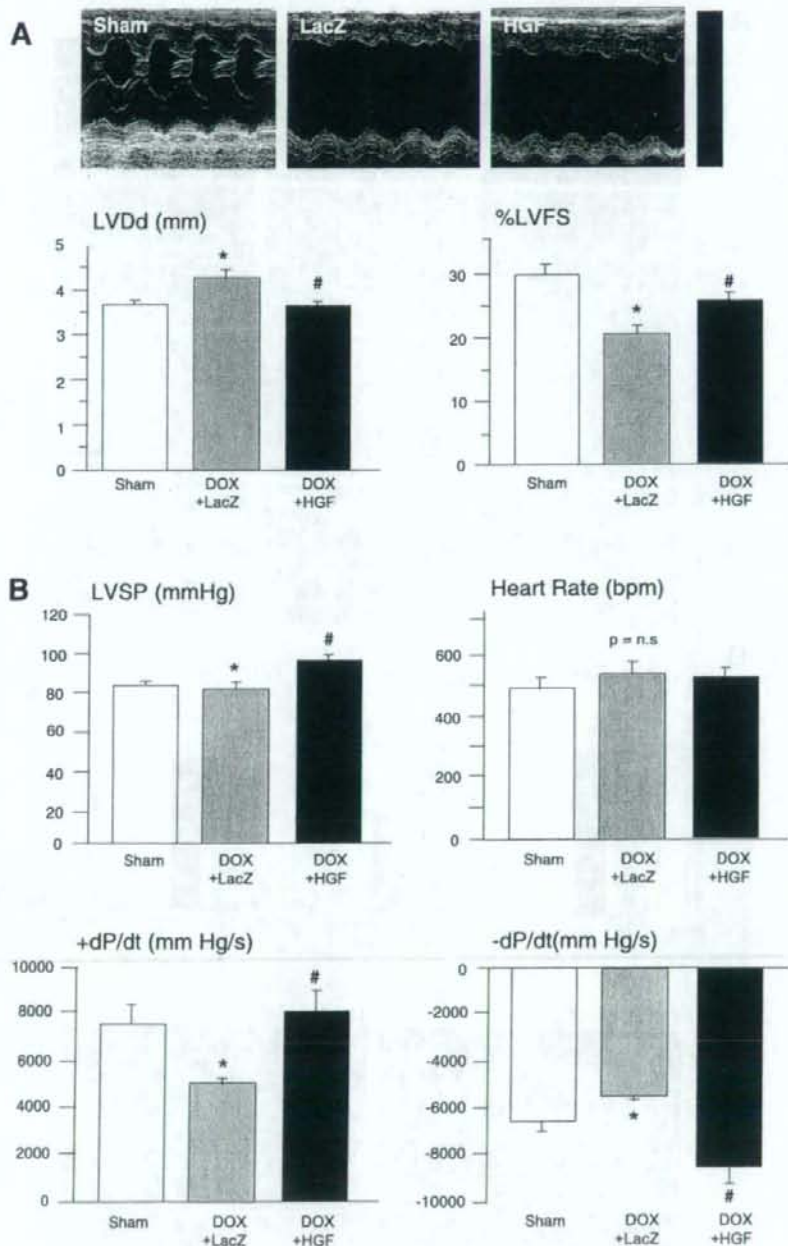


Fig. 2. Effects of hHGF gene delivery on cardiac remodeling and function assessed 4 wk after Dox injection (protocol 1). The indicated parameters were measured using echocardiography (A) and cardiac catheterization (B). LVDd, left ventricular (LV) end-diastolic diameter; %LVFS, %LV fractional shortening; LVSP, LV peak systolic pressure; bpm, beats/min; \pm dP/dt, maximum and minimum first derivative of pressure. * $P < 0.05$ vs. sham group; # $P < 0.05$ vs. Dox + LacZ group.

Cruz), transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1, Promega), cyclooxygenase-2 (Santa Cruz), and Akt or ERK (both from Cell Signaling). Activation of Akt and ERK was assessed using antibodies against the phosphorylated form of Akt (p-Akt) and p-ERK (both from Cell Signaling), respectively. Procaspase-3 and the activated form of caspase-3 were evaluated using anti-caspase-3 antibody (Santa Cruz). Western blot analysis of hHGF was performed using anti-human IgG antibody (DAKO). Three to five hearts from each group were subjected to the blotting. The blots were visualized by means of enhanced chemiluminescence

(Amersham), and the signals were quantified by densitometry. α -Tubulin (analyzed using an antibody from Santa Cruz) served as the loading control.

Immunoprecipitation and Western blot analysis for c-Met. Heart tissue lysates were subjected to immunoprecipitation assays carried out with Ultra-Link Biosupport medium (Pierce) using anti-c-Met antibody (Santa Cruz). Thereafter, the immunoprecipitate was analyzed by Western blot analysis using the same antibody. Three to five hearts from each group and three normal livers were subjected to the assay.

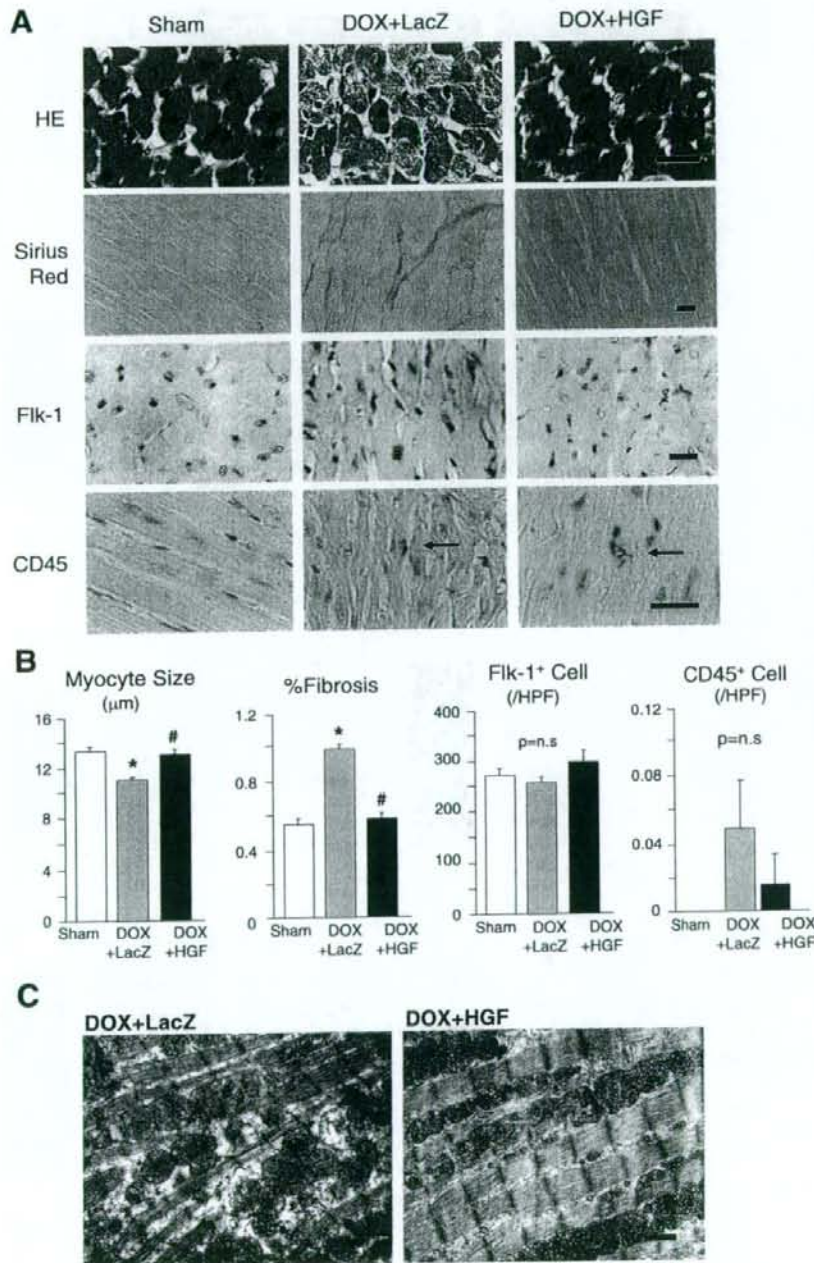


Fig. 3. Effects of hHGF gene delivery on cardiac histology in mice 4 wk after Dox administration (protocol 1). **A**: photomicrographs of histological [hematoxylin-eosin (HE) and Sirius red stained] and immunohistochemical (Flk-1 and CD45) preparations of heart specimens from the indicated groups. Arrows point to immunopositive cells; scale bars, 20 μ m. **B**: morphometric data. * P < 0.05 vs. sham group; # P < 0.05 vs. Dox + LacZ group. **C**: electron photomicrographs of doxorubicin-induced cardiomyopathy treated with LacZ or hHGF gene (bar, 1 μ m).

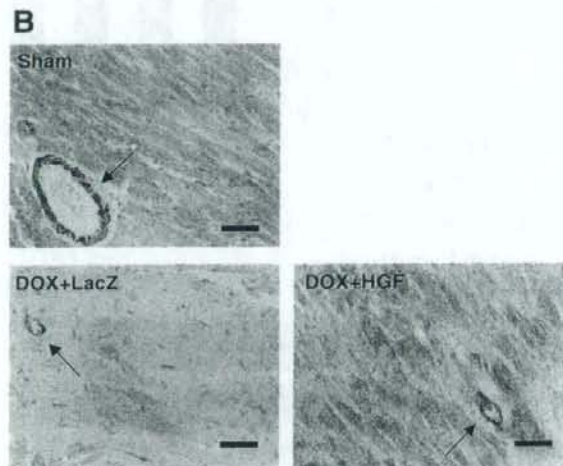
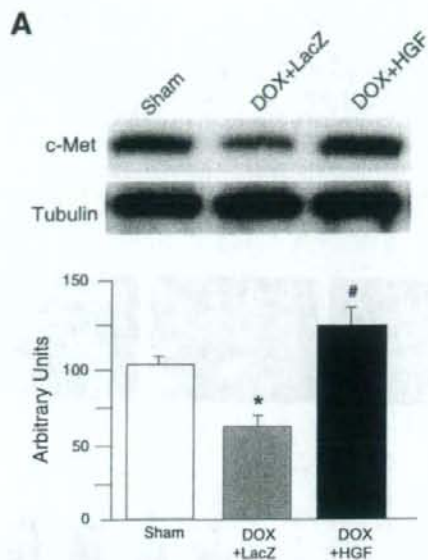


Fig. 4. c-Met expression in the heart. Western blot (A) and immunohistochemical (B) analyses. * $P < 0.05$ vs. sham group; # $P < 0.05$ vs. Dox + LacZ group. Arrows indicate intramyocardial vessels. Bars, 20 μ m.

Statistical analysis. Values are shown as means \pm SE. Survival was assessed by constructing Kaplan-Meier curves, which were analyzed using the log-rank Cox-Mantel method. The significance of differences between groups was evaluated using one-way ANOVA with a post hoc Newman-Keuls multiple comparisons test. Values of $P < 0.05$ were considered significant.

Fig. 5. Western blot analysis of sarcomere-related (A) and fibrosis-related (B) proteins. A: myocardial expression of GATA-4 and myosin heavy chain (MHC). B: myocardial expression of transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1) and cyclooxygenase-2 (COX-2). Graphs are not shown for TGF- β 1 and COX-2 since there were no significant differences among the groups. * $P < 0.05$ vs. sham group; # $P < 0.05$ vs. DOX + LacZ group.

